

УДК 576.895.121 : 577.114.4

© 1990

ДИНАМИКА ДЕСОРБЦИИ КАРБОГИДРАЗ С ПОВЕРХНОСТИ КИШЕЧНИКА РЫБ И ПАРАЗИТИРУЮЩИХ В НИХ ЦЕСТОД

Г. И. Извекова

Изучена динамика десорбции общей суммы карбогидраз с пищеварительно-транспортных поверхностей рыб и паразитирующих в них цестод. Установлен значительный вклад ферментативной активности хозяина в общую ферментативную активность паразита.

Паразитизм в значительной степени определяется пищевыми взаимоотношениями организмов. Известно, что в связи с отсутствием у цестод кишечника гидролиз и всасывание питательных веществ происходит на поверхности тегумента. Строение его в некоторой степени сходно со структурой щеточной каймы энтероцитов у позвоночных животных (Smyth, 1972; Куперман, 1988). В настоящее время тегумент цестод рассматривают как пищеварительно-абсорбционную структуру, на которой происходят заключительные этапы пищеварения и всасывание нутриентов (Pappas, Read, 1975). Многими авторами исследовалась пищеварительная способность тегумента цестод. Строгие доказательства наличия в тегументе цестод различных ферментов, участвующих в мембранном пищеварении, получены в экспериментах с изолированной «щеточной каймой» (микротрихиями) червей (Knowles, Oaks, 1979). Установлено, что «щеточная кайма» *H. diminuta* и *H. microstoma* содержит следующие ферменты: щелочную фосфатазу, аденозинтрифосфатазу, рибонуклеазу и фосфодиэстеразу (Pappas, Narcisi, 1982). Различные исследователи показали, что на поверхности гельминтов адсорбируются ферменты кишечника хозяина. Это приводит к изменению ее ферментативной активности (Taylor, Thomas, 1968; Аркинд, Раева, 1971; Read, 1973) и свидетельствует об участии процессов мембранного пищеварения в усвоении пищи ленточными червями. Важная роль этого механизма в процессах гидролиза пищевых веществ ранее была установлена для различных таксономических групп животных, в том числе и для рыб (Уголев, 1985; Кузьмина, 1978, 1986).

В разработке проблемы взаимоотношений паразитов и их хозяев определенное значение имеет сравнительное изучение ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у цестод и у их хозяев — рыб. Сопоставление активности некоторых щеточно-каемных ферментов, функционирующих в слизистой кишечника рыб и у паразитирующих в них цестод, показало принципиальное сходство структурно-функциональной организации их пищеварительно-транспортных поверхностей (Кузьмина, Куперман, 1983). В связи с тем что углеводы играют важную роль в жизнедеятельности гельминтов, а продукты их гидролиза, в частности глюкоза, активно транспортируются через тегумент, необходимо изучение карбогидраз, участвующих в мембранном гидролизе полисахаридов

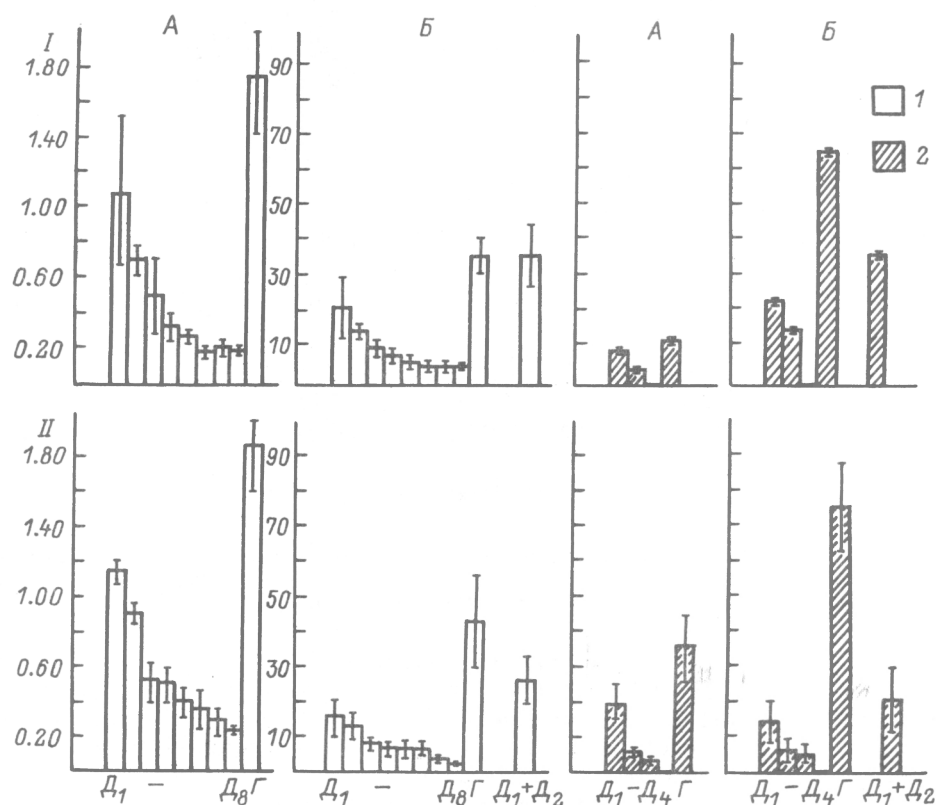


Рис. 1. Общая амилолитическая активность фракций, десорбированных с пищеварительно-транспортных поверхностей налима и *E. rugosum*.

I — налима; 2 — *E. rugosum*; *I* — температура инкубации 5°, *II* — температура инкубации 20°; по оси абсцисс — фракции: D_1 — D_8 — активность десорбируемых ферментов; *G* — активность гомогената; по оси ординат: *A* — общая амилолитическая активность, мМ; *B* — активность ферментов в процентах от суммарной активности препарата, принятой за 100 %.

Fig. 1. General amylolytic activity of fractions desorbed from the digestive-absorptive surfaces of burbot and *E. rugosum*.

у цестод и рыб. В настоящей работе представлены результаты исследования прочности фиксации суммарной смеси карбогидраз на структурах пищеварительно-транспортных поверхностей цестод и кишечника их хозяев — рыб.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили цестоды *Eubothrium rugosum* из кишечника налима (*Lota lota*) и *Triaenophorus nodulosus* из кишечника щуки (*Esox lucius*), а также налима и щука Рыбинского водохранилища. Материал собран в зимне-весенний период. Гельминтов и кишечник исследовали через 2—3 ч после отлова рыб.

Для изучения прочности фиксации карбогидраз на энтероцитах кишечника рыб и у гельминтов использовали метод последовательной десорбции ферментов с отрезков кишки (Кузьмина, 1976). Исследуемые препараты (несколько особей гельминтов общим весом 1000—1500 мг или отрезок среднего отдела кишечника рыб длиной 4—6 см) помещали в пробирки с 10 мл охлажденного раствора Рингера для холоднокровных животных без глюкозы (pH 7.4), которые встря-

хивали в Шуттель-аппарате. Затем препараты последовательно переносили в другие пробирки с раствором Рингера и повторяли встряхивание. Первую фракцию (D_1) получали после 30-секундного встряхивания, остальные ($D_2—D_8$) — через каждые 15 мин. После этого слизистую кишечника снимали скребком, взвешивали и гомогенизировали в 10 мл раствора Рингера. Гельминтов гомогенизировали в растворе Рингера целиком.

Общую амилолитическую активность определяли по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969). В качестве субстрата использовали 1.8 %-ный раствор растворимого крахмала, приготовленного на растворе Рингера. Скорость гидролиза крахмала выражали в мМ глюкозы за 60 мин инкубации в расчете на 100 мг навески ткани. Инкубацию ферментативно-активного препарата и субстрата осуществляли в течение 60 мин при температуре 5 и 20° (20° — стандартная температура, принятая при изучении ферментативных процессов у рыб, 5° — температура, близкая к природной в период проведения исследования).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая амилолитическая активность фракции D_1 (и частично D_2) отражает активность ферментов, не сорбированных на поверхности исследуемых препаратов (амилолитическая активность межворсинчатых пространств слизистой

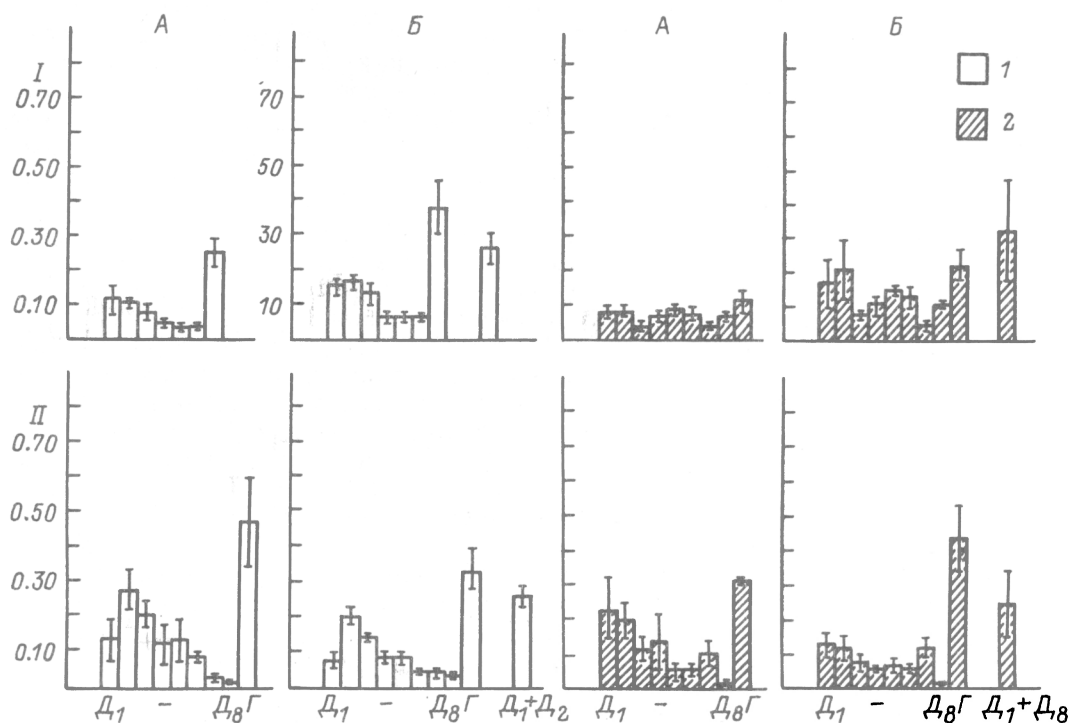


Рис. 2. Общая амилолитическая активность фракций, десорбированных с пищеварительно-транспортных поверхностей щуки и *T. nodulosus*.

1 — щука; 2 — *T. nodulosus*.

Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 2. General amylolytic activity of fractions desorbed from the digestive-absorptive surfaces of pike and *T. nodulosus*.

кишечника). Последующие фракции отражают активность ферментов, принимающих участие в мембранном пищеварении, прочность фиксации которых на структурах пищеварительно-транспортной поверхности увеличивается в ряду $D_1—D_8$. Фракция гомогената (G) слизистой кишечника отражает активность ферментов, прочно фиксированных на микроворсинках энтероцитов, фракция G гельминтов — активность карбогидраз, связанную с покровами тела, а также, возможно, активность ферментов из их внутренних органов (Кузьмина, Куперман, 1983). Легко десорбируемые фракции, очевидно, в основном состоят из адсорбированной панкреатической α -амилазы, а прочно связанные фракции из собственно кишечных ферментов (γ -амилаза, мальтаза, сахараза), функционирующих в составе фермент-мембранных комплексов (Кузьмина, 1985).

Данные по кинетике десорбции карбогидраз с пищеварительно-транспортных поверхностей *E. rugosum* и кишечника налима приведены на рис. 1, а *T. nodulosus* и кишечника щуки — на рис. 2. Полученные данные хорошо согласуются с приведенными Кузьминой и Куперманом (1983) характеристиками для α -амилазы этих животных. Однако нами получено большее количество фракций различной прочности фиксации ферментов (8 вместо 4). Это связано с тем, что нами исследовалась сумма различных ферментов, гидролизующих поли-, олиго- и дисахариды. Активность всех полученных ферментативных фракций у налима значительно выше, чем у *E. rugosum* (рис. 1). Это свидетельствует о меньшей емкости ферментативного пула и, видимо, о меньшей адсорбционной способности тегумента *E. rugosum* по сравнению со слизистой кишечника. Как у налима, так и у *E. rugosum* активность в ряду $D_1—D_8$ достоверно снижается, причем у гельминтов уже во фракциях $D_3—D_4$ (в зависимости от температуры) активность карбогидраз не обнаруживается. Как у налима, так и у *E. rugosum* наибольшая активность наблюдается в гомогенате и составляет 35—43 % для налима и 65—75 % — для *E. rugosum* в зависимости от температуры (рис. 1). Также большая доля активности падает на легко десорбируемые фракции D_1 и D_2 . Для налима это 26—35, а для *E. rugosum* — 29—35 % от суммы активности карбогидраз. Достоверной разницы значений между фракциями, полученными при десорбции фермента с поверхности кишечника налима в зависимости от температуры не найдено. Это согласуется с данными о значительной адаптированности налима к функционированию при низких температурах, характерных для периода наиболее интенсивного питания (Кузьмина, 1985). У *E. rugosum*, однако, ферментативная активность при 5° ниже, чем при 20° и уже во фракции D_3 при 5° активность ферментов не наблюдается.

Несколько иная картина десорбции карбогидраз получена для кишечника щуки и *T. nodulosus*. Активность в ряду $D_1—D_8$ у щуки постепенно снижается, сохраняясь во фракциях $D_6—D_8$ на одном уровне. У *T. nodulosus* достоверного снижения активности фракций не обнаружено, что может быть связано с разнообразностью используемого в опытах материала (в одной щуке присутствуют черви разного размера и, следовательно, с различной способностью поверхности к адсорбции) (Куперман, 1988). Наибольшая активность карбогидраз и у щуки, и у *T. nodulosus* наблюдается в гомогенате (рис. 2), и составляет 34—38 и 23—44 % в зависимости от температуры. Легко десорбируемые фракции D_1 и D_2 не превышают у этих организмов 27 и 25—33 %. Как у щуки, так и у *T. nodulosus* наблюдается зависимость общей амилолитической активности от температуры: при 20° она достоверно выше, чем при 5°. Активность легко десорбируемых фракций у щуки и *T. nodulosus* значительно не различается, что свидетельствует о большой адсорбционной емкости тегумента червей.

Кроме того, интересно отметить, что у налима общая амилолитическая активность всех фракций в 2—5 раз (а в некоторых случаях и больше) выше, чем у щуки. Аналогичное соотношение наблюдается при сравнении активности ферментов у *E. rugosum* и *T. nodulosus*. Это в основном согласуется с данными,

полученными при исследовании α -амилазы у этих животных (Кузьмина, Куперман, 1983). Известно, что уровни общей амилалитической активности и активности α -амилазы у типичного хищника щуки в 2—7 раз ниже, чем у хищника — факультативного бентофага налима (Кузьмина, 1986). Поскольку у паразитов сохраняется соотношение ферментативной активности хозяев, можно предположить, что черви используют в основном адсорбированные из кишечника хозяина карбогидразы. Существенные различия наблюдаются также в распределении ферментативной активности по фракциям у налима и *E. rugosum*, с одной стороны, и щуки и *T. nodulosus* — с другой. Активность ферментов в легко десорбируемых фракциях (D_1 и D_2) и в гомогенате у налима составляет до 70 %, а у *E. rugosum* до 100 % суммарной амилалитической активности. У щуки и *T. nodulosus* активность этих фракций составляет около 60, а остальные 40 % равномерно распределяются между фракциями D_3 — D_8 . Это, видимо, отражает видовые особенности строения пищеварительно-транспортных поверхностей рыб и существенно сказывается на свойствах паразитирующих в них цестод.

Слизистая кишечника адсорбирует на своей поверхности панкреатическую α -амилазу, поэтому данные по десорбции карбогидраз свидетельствуют о различной прочности фиксации ферментов на структурах энтероцитов (Кузьмина, Куперман, 1983). Показано, что цестоды не имеют собственной амилалитической активности, но способны адсорбировать α -амилазу хозяина, что усиливает гидролитическую функцию и позволяет рассматривать тегумент, как пищеварительно-транспортную поверхность (Аркинд, Раева, 1971; Taylor, Thomas, 1968; Read, 1973). Это позволяет предположить, что фракции D_1 — D_8 , полученные при изучении цестод, содержат кишечные карбогидразы с различной степенью прочности адсорбированные тегументом. В имеющейся литературе по углеводному обмену гельминтов нет данных о наличии в тканях этих организмов каких-либо амилаз (Сопрунов, 1984). Однако имеются сообщения о существовании в тканях половозрелой *H. diminuta* 3 олигосахаридаз: β -D-гликозидазы, α -D-галактозидазы и β -глицеронидазы, причем наивысшая способность к гидролизу олигосахаридов была отмечена в тегументе, субтегументальной паренхиме и некоторых других органах (Мосзоń, 1980). Ранее в гомогенате исследованных цестод была найдена активность сахаразы — типичного щеточно-каемного фермента (Кузьмина, Куперман, 1983). Основываясь на этих данных, можно предположить, что активность фракции гомогената у исследованных нами цестод может складываться из активностей названных выше ферментов и из активности адсорбированной из кишечника α -амилазы, прочно связанной с поверхностью червей. Однако измерить соотношение количества внутренних ферментов и ферментов, связанных с поверхностью тегумента, используемой методикой, к сожалению, не представляется возможным.

Полученные данные подтверждают вероятность осуществления заключительных этапов гидролиза углеводов на поверхности тела гельминтов и свидетельствуют об участии процессов мембранного пищеварения в усвоении пищи у ленточных червей. Это указывает на определенное сходство процесса пищеварения у гельминтов и их хозяев — рыб. Более низкий уровень активности ферментов (по сравнению с хозяином) цестоды компенсируют эффективно функционирующими системами транспорта мономеров, в частности глюкозы. Ранее нами было показано существование механизмов активного транспорта у указанных видов цестод и их большая эффективность по сравнению с характеристиками аккумуляции углеводов у рыб, у которых преобладают механизмы простой и облегченной диффузии (Извекова, 1988; Кузьмина и др., 1986). Осуществление заключительных этапов гидролиза полисахаридов на поверхности тегумента, видимо, дает цестодам кинетические преимущества для абсорбции продуктов гидролиза. Аналогичные данные при сопряжении процессов гидролиза и транспорта различных нутриентов получены для позвоночных животных (Уголев, 1985).

Таким образом, тегумент цестод представляет собой сложно организованную, физиологически активную поверхность, способную адсорбировать и использовать в процессах жизнедеятельности ферменты хозяина, что свидетельствует о глубокой адаптации цестод к условиям существования. Способность цестод гидролизовать нутриенты с помощью собственных и адсорбированных ферментов подтверждает представление о наличии у этих организмов такого механизма гидролиза, как мембранное пищеварение, обнаруженное ранее у различных групп позвоночных и беспозвоночных животных (Уголев, 1985).

Список литературы

- Аркинд М. В., Раева И. И. Мембранное (пристеночное) пищеварение у цестод // ЖЭБиФ. 1971. Т. 7, № 4. С. 375—379.
- Извекова Г. И. Характеристика транспорта глюкозы у цестоды *Eubothrium rugosum* // Паразитология. 1988. Т. 22, вып. 2. С. 337—341.
- Кузьмина В. В. Применение метода последовательной десорбции α -амилазы с отрезка кишки при изучении мембранного пищеварения у рыб // Вопр. ихтиол. 1976. Т. 16, вып. 5. С. 944—946.
- Кузьмина В. В. Мембранное пищеварение у круглоротых рыб // Вопр. ихтиол. 1978. Т. 18, вып. 4. С. 684—696.
- Кузьмина В. В. Температурные адаптации ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у пресноводных костистых рыб // Журн. общ. биол. 1985. Т. 46, № 6. С. 824—837.
- Кузьмина В. В. Общие закономерности мембранного пищеварения у рыб и его адаптивные перестройки: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Л., 1986. С. 39.
- Кузьмина В. В., Куперман Б. И. Сравнительная характеристика мембранного пищеварения у цестод и их хозяев — рыб // Паразитология. 1983. Т. 17, вып. 6. С. 436—442.
- Кузьмина В. В., Извекова Г. И., Голованова И. Л. Особенности транспорта углеводов в кишечнике рыб // Мембранное пищеварение и всасывание. Рига, 1986. С. 72—74.
- Куперман Б. И. Функциональная морфология низших цестод. Л.: Наука, 1988. 167 с.
- Сопрунов Ф. Ф. Успехи в изучении углеводного обмена гельминтов // Тр. ГЕЛАН СССР. 1984. Т. 32. С. 121—154.
- Уголев А. М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций Л.: Наука, 1985. 544 с.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека (обзор совр. методов). Л.: Наука, 1969. С. 192—196.
- Knowles W. J., Oaks J. A. Isolation and partial biochemical characterization of the brush border plasma membrane from the cestode *Hymenolepis diminuta* // J. Parasitol. 1979. Vol. 65. p. 715—731.
- Moczón T. Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta* (Rud., 1849) (Cestoda) XI. Some hydrolases of oligosaccharides in mature tapeworm // Acta parasit. pol. 1980. Vol. 27. P. 477—486.
- Pappas P. W., Narcisi E. M. A comparison of membrane—bound enzymes of the isolated brush border plasma membranes of the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *H. microstoma* // Parasitology. 1982. Vol. 84. N 2. P. 391—396.
- Pappas P. W., Read C. P. Membrane transport in Helminth parasites: a review // Exp. Parasitol. 1975. Vol. 37, N 3. P. 469—530.
- Read C. P. Contact digestion in tapeworms // J. Parasitol. 1973. Vol. 59. P. 672—677.
- Smith J. D. Changes in the digestive—absorptive surface of cestodes during larval adult differentiation // Symp. Brit. Soc. parasitol. 1972. Vol. 10. P. 41—70.
- Taylor E. W., Thomas J. N. Membrane (contact) digestion in the three species of tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis microstoma* and *Moniezia expansa* // Parasitology. 1968. Vol. 58, N 3. P. 535—546.

ИБВВ, Борок

Поступила 4.11.1988

PECULIARITIES OF HYDROLYSIS OF POLYSACCHARIDES IN CESTODES AND IN THE
INTESTINE OF THEIR FISH HOSTS

G. I. Izvekova

Key words: amylolytic enzymes, digestive-absorptive surface, intestine, host, cestode

S U M M A R Y

Data are obtained on the fixation strength of carbohydrases on the structures of digestive-absorptive surfaces of cestodes and intestines of their fish hosts. A dependence of the parasite's digestive activity on the activity of the host's enzymes has been established. General regularities of desorption dynamics of carbohydrases in studied animals and their specific peculiarities are noted.
